

**Acknowledgments** We thank Shin-ichi Muramatsu, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Takashi Inui, Osamu Onodera, and Mariano Carrion-Vazquez for their helpful discussions, and Nobuhiro Fujikake and Yuma Okamoto for their technical assistance. Our work on the polyglutamine diseases is supported, in part, by Grants-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas (Advanced Brain Science Project, and Research on Pathomechanisms of Brain Disorders to Y.N.) and by a Comprehensive Brain Science Network Award for Young Scientists (to H.A.P.) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan; by Grants-in-Aid for Scientific Research (B) (to Y.N.), (C) (to H.A.P) and Challenging Exploratory Research (to Y.N.) from the Japan Society for the Promotion of Science, Japan; by a Grant-in-Aid for the Research Committee for Ataxic Diseases (to Y.N.) from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan; and by a grant from Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST) of the Japan Science and Technology Agency (CREST) (to Y.N.).

**Required Author Forms** Disclosure forms provided by the authors are available with the online version of this article.

## References

- Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;120:885-890.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M.  $\alpha$ -synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997;388:839-840.
- Ross CA, Poirier MA. Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:891-898.
- Soto C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:49-60.
- Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 2002;296:1991-1995.
- Gusella JF, MacDonald ME. Molecular genetics: unmasking polyglutamine triggers in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci* 2000;1:109-115.
- Orr HT, Zoghbi HY. Trinucleotide repeat disorders. *Annu Rev Neurosci* 2007;30:575-621.
- Faber PW, Alter JR, MacDonald ME, Hart AC. Polyglutamine-mediated dysfunction and apoptotic death of a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:179-184.
- Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, et al. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 1996;87:493-506.
- Ordway JM, Tallaksen-Greene S, Gutekunst CA, Bernstein EM, Cearley JA, Wiener HW, et al. Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell* 1997;91:753-763.
- Warrick JM, Paulson HL, Gray-Board GL, Bui QT, Fischbeck KH, Pittman RN, et al. Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in *Drosophila*. *Cell* 1998;93:939-949.
- Nagai Y, Inui T, Popiel HA, Fujikake N, Hasegawa K, Urade Y, et al. A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nat Struct Mol Biol* 2007;14:332-340.
- Bauer PO, Nukina N. The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies. *J Neurochem* 2009;110:1737-1765.
- Michalik A, Van Broeckhoven C. Pathogenesis of polyglutamine disorders: aggregation revisited. *Hum Mol Genet* 2003;12 Spec No 2:R173-186.
- Nagai Y, Popiel HA. Conformational changes and aggregation of expanded polyglutamine proteins as therapeutic targets of the polyglutamine diseases: exposed  $\beta$ -sheet hypothesis. *Curr Pharm Des* 2008;14:3267-3279.
- Shao J, Diamond MI. Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Hum Mol Genet* 2007;16 Spec No. 2: R115-123.
- Williams AJ, Paulson HL. Polyglutamine neurodegeneration: protein misfolding revisited. *Trends Neurosci* 2008;31:521-528.
- Di Prospero NA, Fischbeck KH. Therapeutics development for triplet repeat expansion diseases. *Nat Rev Genet* 2005;6:756-765.
- Steffan JS, Bodai L, Pallos J, Poelman M, McCampbell A, Apostol BL, et al. Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 2001;413:739-743.
- Bates G. Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. *Lancet* 2003;361:1642-1644.
- Frost B, Diamond MI. Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2010;11:155-159.
- Herbst M, Wanker EE. Therapeutic approaches to polyglutamine diseases: combating protein misfolding and aggregation. *Curr Pharm Des* 2006;12:2543-2555.
- Soto C, Kindy MS, Baumann M, Frangione B. Inhibition of Alzheimer's amyloidosis by peptides that prevent  $\beta$ -sheet conformation. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226:672-680.
- Trottier Y, Lutz Y, Stevanin G, Imbert G, Devys D, Cancel G, et al. Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature* 1995;378:403-406.
- Nagai Y, Tucker T, Ren H, Kenan DJ, Henderson BS, Keene JD, et al. Inhibition of polyglutamine protein aggregation and cell death by novel peptides identified by phage display screening. *J Biol Chem* 2000;275:10437-10442.
- Okamoto Y, Nagai Y, Fujikake N, Popiel HA, Yoshioka T, Toda T, et al. Surface plasmon resonance characterization of specific binding of polyglutamine aggregation inhibitors to the expanded polyglutamine stretch. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;378:634-639.
- Hervas R, Oroz J, Galera-Prat A, Goni O, Valbuena A, Vera AM, et al. Common features at the start of the neurodegeneration cascade. *PLoS Biol* 2012;10:e1001335.
- Ren H, Nagai Y, Tucker T, Strittmatter WJ, Burke JR. Amino acid sequence requirements of peptides that inhibit polyglutamine-protein aggregation and cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:703-710.
- Takahashi T, Kikuchi S, Katada S, Nagai Y, Nishizawa M, Onodera O. Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. *Hum Mol Genet* 2008;17:345-356.
- Takahashi Y, Okamoto Y, Popiel HA, Fujikake N, Toda T, Kinjo M, et al. Detection of polyglutamine protein oligomers in cells by fluorescence correlation spectroscopy. *J Biol Chem* 2007;282:24039-24048.
- Bilen J, Bonini NM. *Drosophila* as a model for human neurodegenerative disease. *Ann Rev Genet* 2005;39:153-171.
- Nagai Y, Fujikake N, Ohno K, Higashiyama H, Popiel HA, Rahadian J, et al. Prevention of polyglutamine oligomerization and neurodegeneration by the peptide inhibitor QBP1 in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 2003;12:1253-1259.
- Okada T, Nomoto T, Shimazaki K, Lijun W, Lu Y, Matsushita T, et al. Adeno-associated virus vectors for gene transfer to the brain. *Methods* 2002;28:237-247.
- Popiel HA, Takeuchi T, Fujita H, Yamamoto K, Ito C, Yamane H, et al. Hsp40 gene therapy exerts therapeutic effects on polyglutamine disease mice via a non-cell autonomous mechanism. *PLoS ONE* 2012;7:e51069.
- Bauer PO, Goswami A, Wong HK, Okuno M, Kurosawa M, Yamada M, et al. Harnessing chaperone-mediated autophagy for

- the selective degradation of mutant huntingtin protein. *Nat Biotech* 2010;28:256-263.
36. Duque S, Joussemet B, Riviere C, Marais T, Dubreil L, Douar AM, et al. Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol Ther* 2009;17:1187-1196.
  37. Joliot A, Prochiantz A. Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat Cell Biol* 2004;6:189-196.
  38. Wadia JS, Dowdy SF. Protein transduction technology. *Curr Opin Biotech* 2002;13:52-56.
  39. Popiel HA, Nagai Y, Fujikake N, Toda T. Protein transduction domain-mediated delivery of QBP1 suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration *in vivo*. *Mol Ther* 2007;15:303-309.
  40. Popiel HA, Nagai Y, Fujikake N, Toda T. Delivery of the aggregate inhibitor peptide QBP1 into the mouse brain using PTDs and its therapeutic effect on polyglutamine disease mice. *Neurosci Lett* 2009;449:87-92.
  41. Hamuro L, Zhang G, Tucker TJ, Self C, Strittmatter WJ, Burke JR. Optimization of a polyglutamine aggregation inhibitor peptide (QBP1) using a thioflavin T fluorescence assay. *Assay Drug Dev Tech* 2007;5:629-636.
  42. Tomita K, Popiel HA, Nagai Y, Toda T, Yoshimitsu Y, Ohno H, et al. Structure-activity relationship study on polyglutamine binding peptide QBP1. *Bioorg Med Chem* 2009;17:1259-1263.
  43. Kaye R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 2003;300:486-489.
  44. Ehrnhoefer DE, Bieschke J, Boeddrich A, Herbst M, Masino L, Lurz R, et al. EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat Struct Mol Biol* 2008;15:558-566.
  45. Ehrnhoefer DE, Duennwald M, Markovic P, Wacker JL, Engemann S, Roark M, et al. Green tea (-)-epigallocatechin-gallate modulates early events in huntingtin misfolding and reduces toxicity in Huntington's disease models. *Hum Mol Genet* 2006;15:2743-2751.
  46. Bodles AM, El-Agnaf OM, Greer B, Guthrie DJ, Irvine GB. Inhibition of fibril formation and toxicity of a fragment of  $\alpha$ -synuclein by an N-methylated peptide analogue. *Neurosci Lett* 2004;359:89-93.
  47. Soto C, Sigurdsson EM, Morelli L, Kumar RA, Castano EM, Frangione B.  $\beta$ -sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat Med* 1998;4:822-826.

## 認知症におけるシナプス病態

畑中 悠佑, 和田 圭司, 永井 義隆

### 1. はじめに

脳神経系は、極めて複雑な構造を形成することで、認知、思考、情動、記憶、そして行動に至るまでを司っている。その複雑さの最たるものが、神経細胞間のネットワークであり、このネットワークの構造の可塑性により、高次脳機能が形成される。そして、神経ネットワークを形成する神経細胞間のインターフェースであるシナプスの機能こそが、多様な脳機能の素過程を司るとされている。したがって、認知症などをはじめとする脳機能疾患の端緒となる病態もまた、個々のシナプス機能の異常に帰着されるであろう。

認知症を呈する疾患は多数ある。また、個々の疾患関連遺伝子も多岐にわたり、かつ、そもそも多くの疾患が孤発性である。そのため、個別の分子に依拠した病態機構の把握よりも、“シナプス病態”という異なる疾患に共通する中間形質の理解こそが、最終的な認知症の発症機構の包括的な説明に繋がる

と考えられる。

そこで、本総説では、認知症を呈するときの神経細胞のシナプス病態に着目し、その概説を行う。加えて、シナプスの中でも、興奮性シナプスの受容部位（ポストシナプス）である樹状突起スパインに焦点を当てる。スパインはその形態が機能と関連しており、形態解析により機能の類推が可能である点、ヒト死後脳を用いた臨床からの知見が豊富である点など、疾患研究を進める上で様々な利点があり、形態解析を通じて多くの情報を得ることができる（図1）。さらに、近年の技術革新による2光子励起レーザー顕微鏡の発展から、経時的な *in vivo* イメージングが低侵襲で可能となり、認知症モデルマウスの同一樹状突起上にあるスパインが、症状の進行とともに変性していくメカニズムが明らかにされつつある。本総説では、“シナプス病態”という共通する中間形質に基づいて、原因も病態も多岐にわたる認知症に対する認識を再構築することを目的とする。

### 2. シナプス—機能・形態・動態の連関

#### 2-1. 樹状突起スパインの機能と形態

1888年のRamón y Cajalの報告以来、樹状突起スパインの形態とその機能について、科学技術の発展とともに精力的に研究が続けられ、多くのことが分かってきた（Rochefort & Konnerth, 2012）。スパイ

#### Synapse pathology in dementia

Yuusuke Hatanaka, Keiji Wada, Yoshitaka Nagai

国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第四部  
[〒187-8502 東京都小平市小川東町4-1-1]

Department of Degenerative Neurological Diseases, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry  
(4-1-1 Ogawahigashimachi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan)

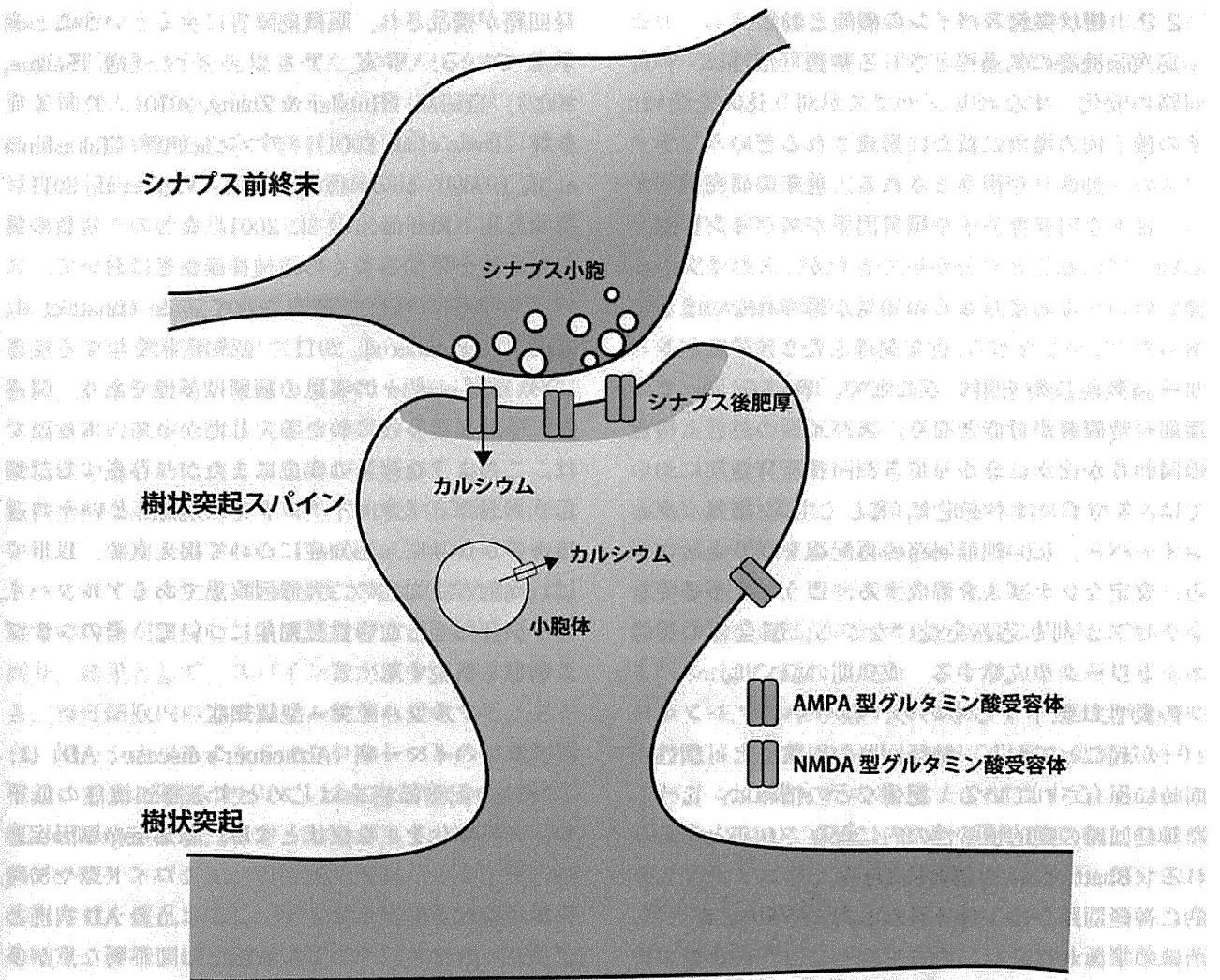


図1. 樹状突起スパイン

興奮性シナプスの後部構造である樹状突起スパインは、シナプス前終末からの入力を受けて、形態変化を起こすことで、可塑性を制御している。

シは樹状突起から伸びた微細な突起で、大脳皮質、海馬、扁桃体、線条体、小脳などの、様々な脳部位の神経細胞に分布し、シナプス前部からの情報を受容している。スパインの大きさは、シナプス後肥厚（電子顕微鏡観察時にシナプス後部膜直下に観察される高電子密度領域、シナプス後部に存在するシナプス関連タンパク質の足場構造）の大きさと相関する（Harris & Stevens, 1988）。また、シナプス後肥厚の大きさは、シナプス前終末にて興奮性シナプスの神経伝達物質であるグルタミン酸を貯蔵するシナプス小胞の数とも比例する（Harris & Stevens, 1989）。さらに、スパインの大きさは、グルタミン

酸の受容体である AMPA 型グルタミン酸受容体の数とも相関がある（Matsuzaki et al., 2001）。したがって、スパインが大きいほど、そのシナプスの伝達強度は高いといえる。AMPA 型グルタミン酸受容体、そして NMDA 型グルタミン酸受容体を介したカルシウム流入によって、アクチン骨格の再構築が誘導され、シナプス伝達強度の長期増強時にはスパインの膨大が、長期抑圧時にはスパインの萎縮が起これ、シナプスの可塑性が制御されている（Cingolani & Goda, 2008）。したがって、スパインの形態を解析することで、固定サンプルでも post hoc にシナプス機能を推定することができる。

## 2-2. 樹状突起スパインの機能と動態

高次脳機能の素過程とされる神経可塑性は、神経回路の変化、すなわちシナプスが刈り込みを受け、その後、別の場所に新たに形成されるという、シナプスの「動態」が担うとされる。近年の研究成果から、様々な内在性分子や環境因子がスパイン形態を制御していることが分かってきたが、スパインの動態についてはあまり多くの知見が得られないままであった。しかしながら、近年発達した2光子励起レーザー顕微鏡技術を用いることで、特に *in vivo* での深部経時観察が可能となり、スパインの動態と機能の関わりが徐々に分かってきた。神経発達期においては、スパインは不安定で、著しく生成・消滅（ターンオーバー）し、神経回路の再配線を繰り返しながら、安定なシナプスを形成する。こうして不必要なシナプスが刈り込みを受けながら、脳全体の神経ネットワークが成熟する。成熟期の脳では、スパインの動態は低下するものの、緩やかにターンオーバーが起こっており、神経回路の恒常性と可塑性が同時に保有されている。記憶などの情報は、こうした神経回路の動的恒常性の内に保存されると考えられる (Bhatt et al., 2009)。成熟脳で経験・活動依存的に神経回路が組み替えられる際、スパインの生成・消滅の平衡が移動し、ここでもやはり、シナプスの刈り込みが発生する (Zuo et al., 2005)。このように、シナプスが刈り込まれることで、神経回路が再構築されるという事象において、神経発達と記憶・学習との間に類似性をみることができる。一方で、記憶・学習により、正味のスパイン数そのものは変化しないものの、スパインのターンオーバー速度が変化するという報告もある (Trachtenberg et al., 2002)。いずれにせよ、スパインの動的恒常性とその可塑性、すなわち、スパイン動態こそが、高次脳機能の素過程を司る本体であろうと推測される。

## 3. シナプス病態

樹状突起スパインの数や形態・動態が脳機能に密接に関与しているということは、逆にいえば、スパインの形態制御機構や動的恒常性の破綻により、神

経回路が攪乱され、脳機能障害に至るということを示している。事実、アルツハイマー病 (Selkoe, 2002)、自閉症 (Hutsler & Zhang, 2010)、脆弱 X 症候群 (Irwin et al., 2001)、ダウン症候群 (Takashima et al., 1994)、不安障害やうつ病 (Vigil et al., 2011)、薬物乱用 (Robinson et al., 2001) などの、複数の異なる症状を呈する多くの精神神経疾患において、スパイン形態の異常が報告されている (Bhatt et al., 2009; Penzes et al., 2011)。認知症状を呈する疾患においても、個々の疾患の病態は多様であり、関連遺伝子もまた多岐にわたる。したがって、本総説では、このような複数の疾患にまたがり存在する認知症状の理解のために、“シナプス病態”という共通項を手がかりに、認知症について捉え直す。以下では、高齢者認知症の二大原因疾患であるアルツハイマー型認知症と血管性認知症について、そのシナプス病態を概説する。

### 3-1. アルツハイマー型認知症

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) は、進行性の記憶障害をはじめとする認知機能の低下や、人格変化を主な症状とする、認知症の原因疾患の一つである。病理学的には、アミロイド斑や神経原線維変化を特徴とするが、このような AD 病理と認知症との関連については依然として不明な点が多い。アミロイド前駆体タンパク質やプレセニリンなど、関連タンパク質の同定も進んでいるが、やはり、その認知機能障害の発症機序について、明確には分かっていない (Selkoe, 1996)。

一方、AD のシナプス病態については、ヒト死後脳を用いた研究から、発症後 2-4 年以内に約 30% のシナプスや樹状突起スパインが減少することが報告されている (Davies et al., 1987)。形態学的な解析の他にも、シナプス関連タンパク質や神経伝達物質合成酵素の減少も報告されており (Small et al., 2001)、シナプス機能の異常が AD の初期病態の一つであるといえる。AD 患者の認知症の重症度とアミロイド  $\beta$  の蓄積が決して相関していない一方で、症状の進行に伴いシナプスが変性していくことが、多くの研究により裏付けられていることから、AD はシナプス機能不全症と考えられている (Sel-

koe, 2002).

AD 関連遺伝子を発現させたアルツハイマー病モデルマウスを用いた研究からも、樹状突起スパインの減少・萎縮をもたらす神経回路異常による脳機能障害が報告されている (Spires et al., 2005). また、健全なマウスの海馬に、ヒト由来アミロイドβオリゴマーを作用させると、スパインの顕著な減少に伴い (Shankar et al., 2008)、長期増強の抑制、すなわちシナプス機能障害が生じる (Jo et al., 2011). さらに、2光子励起顕微鏡を用いた *in vivo* 観察から、スパインの減少、樹状突起や軸索の異常膨化が、加齢に伴い進行的に起こることが示されており、これらの病的な形質は、アミロイド沈着からの距離が近いほど、強く表出される (Tsai et al., 2004). このとき、スパインの生成・消滅速度が増加するとともに、両者の均衡が破綻し、消滅速度の方が生成速度を上回り、結果として、スパイン数が減少する。このとき、神経細胞内のカルシウム動態も変化することから、単一シナプスよりもマクロなレベルの神経回路機能にもまた障害が生じていることが分かっている (Grienberger et al., 2012). したがって、アミロイドβなどのタンパク質が毒性を発揮し、シナプスの動的恒常性を攪乱させ、シナプスの減少を惹起し、その結果、神経回路機能が障害を受け、認知症発症に至ると考えられる。

### 3-2. 脳血管性認知症

脳血管性認知症 (Vascular dementia: VD) は、脳梗塞や脳出血などの脳血管障害に起因する認知症で、AD に次いで患者数が多いことが知られている。通常、樹状突起スパインは、周辺の毛細血管から平均して 10 μm 程度離れた場所に位置し、単位時間あたり約 100 個の赤血球から補給を受けており (Sigler & Murphy, 2010)、虚血に対し高い脆弱性を示す。したがって、脳血管障害時の虚血によるシナプスへの障害について、多くの研究がなされている。

ヒト死後脳研究より、Binswanger 病と Spatz-Lindenberg 病に分類される VD 患者において、海馬でのシナプス関連タンパク質の減少が報告されている (Zhan et al., 1993, 1994). また、頭部外傷による脳

虚血と診断された患者では、樹状突起の膨化やスパインの減少が観察されている (Castejon & Arismendi, 2003). このことから、VD においてもやはり、シナプス病態こそが最終的な認知症状を引き起こす第一義的な機能障害であると推測される。

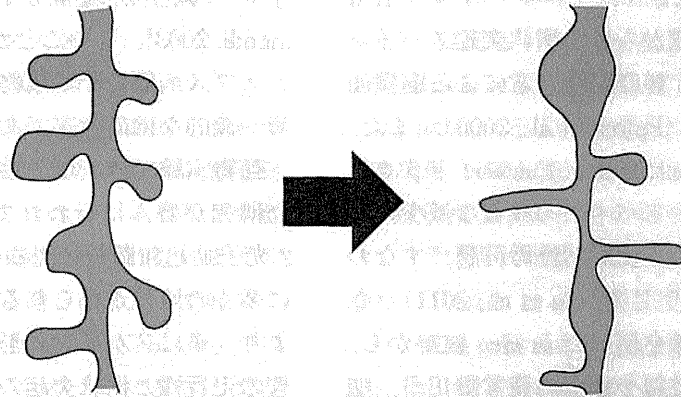
動物実験では、虚血性脳卒中モデルマウスを用いた研究が盛んに行われており、この分野でもまた、2光子励起顕微鏡による *in vivo* 観察により、飛躍的に多くの情報が得られるようになった。この手法により、単にスパインの形態・動態のみならず、脳血管の走行性と樹状突起の空間的な位置関係や、血流のモニタリングも同時に可能となった。人為的に脳虚血を誘導すると、血流減少後わずか数分でスパインの減少が始まる (Zhang et al., 2005). スパインの減少とともに、樹状突起の膨化も起こり、これらの影響は脳虚血部位に対する近接性に依存して強くなる (Enright et al., 2007). さらに、虚血周辺部位においては、スパインのターンオーバー速度が数週間におわたって上昇するが、やがて以前の動態に戻り、スパインの数も元の状態まで回復する (Sigler & Murphy, 2010). 認知・感覚・運動機能などの脳機能は、脳虚血時に著しく障害を受けるが、部分的には自然に快復することが知られており、このような虚血時の脳機能障害の可逆性は、スパイン動態の一過的な亢進による神経回路の再配線、すなわち神経可塑性に依るものであることが示唆される (Murphy & Corbett, 2009).

## 4. まとめ

諸疾患に共通する中間形質としてのシナプス病態

アルツハイマー病・脳血管性認知症ともに、アミロイド沈着や虚血部位に対し、樹状突起スパインは最も脆弱であり、かつその空間配置により重症度が決定される点で共通している。そのとき現れるシナプス病態もまた、スパインの減少・萎縮に伴うシナプス機能の低下、およびスパインのターンオーバー速度の増加後の神経回路の再配線など、多くの表現型を共有する (図2)。認知症以外の多くの精神神経疾患もまた、スパイン動態の亢進という点におい

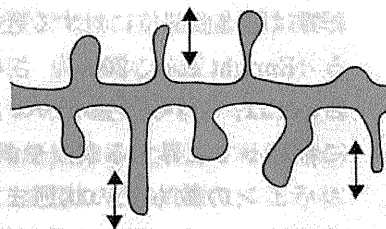
### スパイン形態の異常



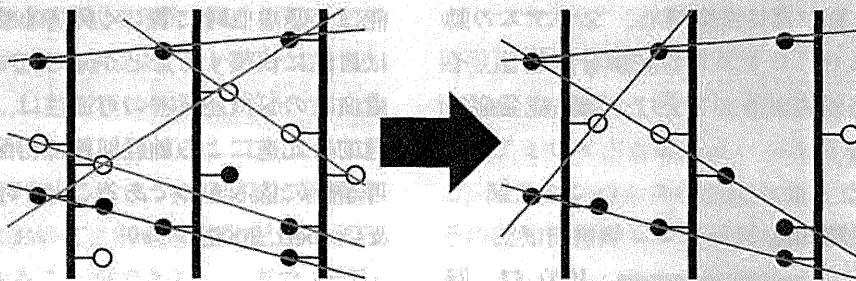
健康なスパイン

疾患時のスパイン

### スパイン動態の異常



スパインの生成・消滅



● 安定なスパイン    ○ 生成・消滅するスパイン  
 | 安定なネットワーク    | 消滅したネットワーク    | 生成したネットワーク

図2. シナプス病態

多くの疾患で、樹状突起スパインの減少・萎縮やターンオーバーの亢進が起こる。これにより、既存の神経回路が消滅し、新たな回路が形成される。

て、共通の中間形質を示す。このことは、複数の精神神経疾患の早期病態として現れるシナプス機能異常の根底に、何らかの共通する病態機序が存在することを示唆するものである。シナプスや神経の変性に先んじて起こるシナプス動態、すなわち可塑性の攪乱こそが、認知症などの脳機能障害に繋がると考

えられ、治療介入もまた、こうした病態が現れる早期に行われる必要があるといえる。最後に、シナプス動態亢進による神経回路の再配線という点において、シナプス病態とは、生理的な神経発達や記憶・学習と相似する現象であるという主張をもって、本総説を締めくくりたい。

## 文 献

- Bhatt DH, Zhang S, Gan WB (2009) Dendritic spine dynamics. *Annu Rev Physiol* 71 : 261-282
- Castejon OJ, Arismendi GJ (2003) Morphological changes of dendrites in the human edematous cerebral cortex. A transmission electron microscopic study. *J Submicrosc Cytol Pathol* 35 : 395-413
- Cingolani LA, Goda Y (2008) Actin in action : the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat Rev Neurosci* 9 : 344-356
- Davies CA, Mann DM, Sumpter PQ, Yates PO (1987) A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 78 : 151-164
- Enright LE, Zhang S, Murphy TH (2007) Fine mapping of the spatial relationship between acute ischemia and dendritic structure indicates selective vulnerability of layer V neuron dendritic tufts within single neurons in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 27 : 1185-1200
- Grienberger C, Rochefort NL, Adelsberger H, Henning HA, Hill DN, Reichwald J, Staufenbiel M, Konnerth A (2012) Staged decline of neuronal function in vivo in an animal model of Alzheimer's disease. *Nat Commun* 3 : 774
- Harris KM, Stevens JK (1988) Dendritic spines of rat cerebellar Purkinje cells : serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci* 8 : 4455-4469
- Harris KM, Stevens JK (1989) Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus : serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci* 9 : 2982-2997
- Hutsler JJ, Zhang H (2010) Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Res* 1309 : 83-94
- Irwin SA, Patel B, Idupulapati M, Harris JB, Crisostomo RA, Larsen BP, Kooy F, Willems PJ, Cras P, Kozlowski PB, Swain RA, Weiler IJ, Greenough WT (2001) Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome : a quantitative examination. *Am J Med Genet* 98 : 161-167
- Jo J, Whitcomb DJ, Olsen KM, Kerrigan TL, Lo SC, Bru-Mercier G, Dickinson B, Scullion S, Sheng M, Collingridge G, Cho K (2011) Abeta (1-42) inhibition of LTP is mediated by a signaling pathway involving caspase-3, Akt1 and GSK-3beta. *Nat Neurosci* 14 : 545-547
- Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai H (2001) Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 4 : 1086-1092
- Murphy TH, Corbett D (2009) Plasticity during stroke recovery : from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci* 10 : 861-872
- Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM (2011) Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 14 : 285-293
- Robinson TE, Gorny G, Mitton E, Kolb B (2001) Cocaine self-administration alters the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and neocortex. *Synapse* 39 : 257-266
- Rochefort NL, Konnerth A (2012) Dendritic spines : from structure to in vivo function. *EMBO Rep* 13 : 699-708
- Selkoe DJ (1996) Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 271 : 18295-18298
- Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298 : 789-791
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14 : 837-842
- Sigler A, Murphy TH (2010) In vivo 2-photon imaging of fine structure in the rodent brain : before, during, and after stroke. *Stroke* 41 : S117-123
- Small DH, Mok SS, Bornstein JC (2001) Alzheimer's disease and Abeta toxicity : from top to bottom. *Nat Rev Neurosci* 2 : 595-598
- Spires TL, Meyer-Luehmann M, Stern EA, McLean PJ, Skoch J, Nguyen PT, Bacskai BJ, Hyman BT (2005) Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *J Neurosci* 25 : 7278-7287
- Takashima S, Iida K, Mito T, Arima M (1994) Dendritic and histochemical development and ageing in patients with Down's syndrome. *J Intellect Disabil Res* 38(Pt 3) : 265-273
- Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, Feng G, Sanes JR, Welker E, Svoboda K (2002) Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* 420 : 788-794



Tsai J, Grutzendler J, Duff K, Gan WB (2004) Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches. *Nat Neurosci* 7: 1181-1183

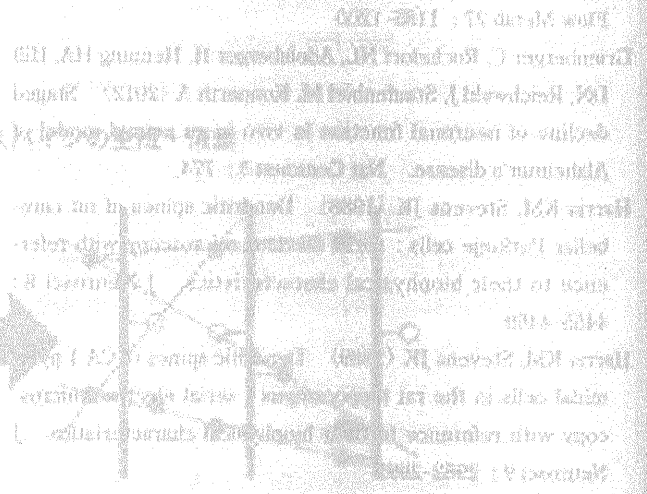
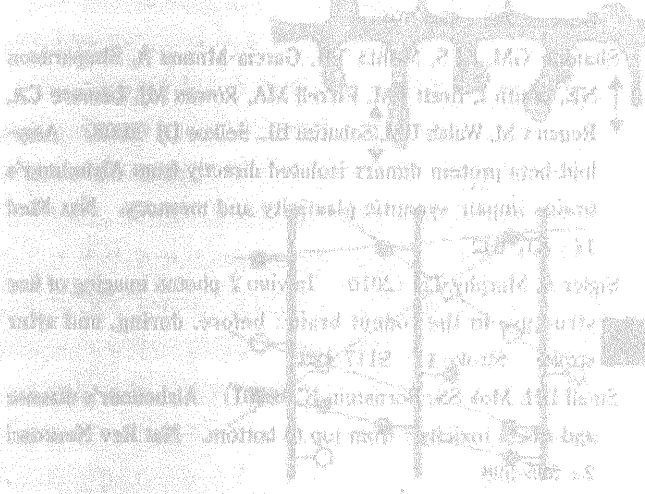
Vigil P, Orellana RF, Cortes ME, Molina CT, Switzer BE, Klaus H (2011) Endocrine modulation of the adolescent brain: a review. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 24: 330-337

Zhan SS, Beyreuther K, Schmitt HP (1993) Vascular dementia in Spatz-Lindenberg's disease (SLD): cortical synaptophysin immunoreactivity as compared with dementia of Alzheimer type and non-demented controls. *Acta Neuropathol* 86: 259-264

Zhan SS, Beyreuther K, Schmitt HP (1994) Synaptophysin immunoreactivity of the cortical neuropil in vascular dementia of Binswanger type compared with the dementia of Alzheimer type and nondemented controls. *Dementia* 5: 79-87

Zhang S, Boyd J, Delaney K, Murphy TH (2005) Rapid reversible changes in dendritic spine structure in vivo gated by the degree of ischemia. *J Neurosci* 25: 5333-5338

Zuo Y, Yang G, Kwon E, Gan WB (2005) Long-term sensory deprivation prevents dendritic spine loss in primary somatosensory cortex. *Nature* 436: 261-265



Zhan SS, Beyreuther K, Schmitt HP (1993) Vascular dementia in Spatz-Lindenberg's disease (SLD): cortical synaptophysin immunoreactivity as compared with dementia of Alzheimer type and non-demented controls. *Acta Neuropathol* 86: 259-264

Zhan SS, Beyreuther K, Schmitt HP (1994) Synaptophysin immunoreactivity of the cortical neuropil in vascular dementia of Binswanger type compared with the dementia of Alzheimer type and nondemented controls. *Dementia* 5: 79-87

Zhang S, Boyd J, Delaney K, Murphy TH (2005) Rapid reversible changes in dendritic spine structure in vivo gated by the degree of ischemia. *J Neurosci* 25: 5333-5338

Zuo Y, Yang G, Kwon E, Gan WB (2005) Long-term sensory deprivation prevents dendritic spine loss in primary somatosensory cortex. *Nature* 436: 261-265

Zhan SS, Beyreuther K, Schmitt HP (1993) Vascular dementia in Spatz-Lindenberg's disease (SLD): cortical synaptophysin immunoreactivity as compared with dementia of Alzheimer type and non-demented controls. *Acta Neuropathol* 86: 259-264

Zhan SS, Beyreuther K, Schmitt HP (1994) Synaptophysin immunoreactivity of the cortical neuropil in vascular dementia of Binswanger type compared with the dementia of Alzheimer type and nondemented controls. *Dementia* 5: 79-87

Zhang S, Boyd J, Delaney K, Murphy TH (2005) Rapid reversible changes in dendritic spine structure in vivo gated by the degree of ischemia. *J Neurosci* 25: 5333-5338

Zuo Y, Yang G, Kwon E, Gan WB (2005) Long-term sensory deprivation prevents dendritic spine loss in primary somatosensory cortex. *Nature* 436: 261-265

### Synapse pathology in dementia

Yuusuke Hatanaka, Keiji Wada, Yoshitaka Nagai

Department of Degenerative Neurological Diseases, National Institute of Neuroscience,  
National Center of Neurology and Psychiatry

The function of synapses is essential for regulating synaptic plasticity and many brain functions. Therefore, synapse pathology is likely to be a central cause of brain dysfunctions including dementia. Postsynaptic structures called 'dendritic spines' receive excitatory inputs from presynaptic neurons. Because there is a clear correlation between synaptic function and dynamic morphology of spines, time-lapse morphometric analysis of spines is a strong tool for evaluating synaptic function. In this review, we illustrate the commonalities of synapse pathology among several diseases with dementia, that is, decreased spine number and size, and enhanced turnover ratio of spines. These abnormal characteristics of spines can be interpreted as decreased synaptic strength and destabilization of neural circuits.

Address correspondence to Dr. Yoshitaka Nagai, Department of Degenerative Neurological Diseases, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry (4-1-1 Ogawahigashimachi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan)

## ＜教育講演 (2) —6＞

# 神経変性疾患病態研究のキーワード

永井 義隆

(臨床神経 2012;52:874-876)

**Key words** : 蛋白質凝集, 品質管理機構, RNAリピート病, 分子標的治療, バイオマーカー

### 1. 神経変性疾患と蛋白質凝集

神経変性疾患は、元来原因不明の進行性神経細胞変性・脱落により様々な神経・精神症状を呈する疾患群と定義されていたが、1990年代からの飛躍的な分子遺伝学的解析の進歩により、大部分の遺伝性神経変性疾患の原因遺伝子がつぎつぎに同定された。その結果実に驚くべきことに、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、ハンチントン病(HD)、脊髄小脳失調症(SCA)など多くの神経変性疾患において、これらの遺伝子異常によりミスフォールディング・凝集しやすい異常蛋白質が産生されることが明らかになった。遺伝性疾患のみならず、孤発性の神経変性疾患においても神経細胞内外に凝集蛋白質が封入体として蓄積していることが従来から知られており、これらのことから異常蛋白質がミスフォールディング・凝集により毒性を獲得(gain of function)し、神経変性を惹き起こすという広く共通の発症分子メカニズムが想定され、コンフォメーション病もしくはミスフォールディング病と総称されるようになった<sup>1)</sup>。筆者らは、これらの神経変性疾患の中で原因遺伝子内のグルタミンをコードするCAGリピートの異常伸長という共通の遺伝子変異により発症するHD、SCA1, 2, 3, 6, 7, 17, 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、球脊髄性筋萎縮症など9疾患の総称である、いわゆるポリグルタミン(PolyQ)病に着目して研究をおこなっている<sup>2)</sup>。

これらの神経変性疾患の原因蛋白質は、アミノ酸配列はまったくことなるにもかかわらず、注目すべきことに、いずれも共通にβシート構造に富んだアミロイド線維状構造を持つ凝集体を形成する。最近では、神経細胞内外に蓄積した封入体や難溶性のアミロイド様凝集体よりも、βシートに構造転換したモノマーやオリゴマーと呼ばれる可溶性の微細な重合体の方が強い神経毒性を発揮すると考えられている<sup>3)</sup>。しかしながら筆者らは、変性蛋白質のβシート構造転換による神経毒性の獲得だけでなく、アミロイド線維形成・凝集による分解抵抗性の獲得も長期にわたる神経毒性を発揮して晩発性の神経変性疾患の発症に寄与するという露出βシート仮説を提唱している<sup>2)</sup>。さらに最近、このような凝集蛋白質が細胞外に放出され、プリオンのように細胞間を伝播して変性病態を拡大さ

せる可能性が示唆されている<sup>4)</sup>。

一方、生体内にはこのような蛋白質ミスフォールディング・凝集に対する品質管理機構として、分子シャペロンによるフォールディング補正、あるいはユビキチン・プロテアソーム系やオートファジー・リソソーム系などの蛋白質分解システムなどが備わっており、実際にこのような品質管理機構の活性化により変性蛋白質を除去し、神経変性を抑制できることが実験的に示されている<sup>5)6)</sup>。他方、品質管理機構の機能低下によっても神経変性が惹き起こされることが明らかにされており、変性蛋白質の産生・凝集と品質管理機構とのバランス(プロテオスタシス)の破綻が神経変性疾患の発症につながると想定されている<sup>7)</sup>。また最近、疫学研究や動物モデルをもちいた実験により、糖尿病などの代謝異常がプロテオスタシスに影響を与える可能性が示唆されている。

### 2. 神経変性疾患とRNA代謝異常

神経変性疾患の分子遺伝学的解析から、上述のような蛋白質をコードする領域内の遺伝子変異による異常蛋白質のミスフォールディング・凝集を原因とする疾患群だけでなく、非翻訳領域内のリピート配列の異常伸長により発症する脆弱X関連振戦/運動失調症候群(FXTAS: CGGリピート)、SCA8(CTGリピート)、SCA10(ATTCTリピート)、SCA12(CAGリピート)、SCA31(TGGAAリピート)、SCA36(GGCCTGリピート)など一群の神経変性疾患が徐々に明らかにされてきた。これらの疾患では、異常伸長リピートを持つRNAの毒性獲得(gain of function)による神経変性メカニズムが想定され、RNAリピート病と総称されている<sup>8)</sup>。RNAリピート病のうちもっとも研究が進んでいる筋強直性ジストロフィーでは、蓄積した異常RNA自身による神経毒性獲得と、蓄積RNAに巻き込まれるRNA結合蛋白質の機能喪失によるRNAスプライシング異常などに基づく発症メカニズムが示唆されている。

一方ALSにおいて、近年、RNA結合蛋白質であるTDP-43やFUSの遺伝子変異が同定され、これらの蛋白質の凝集・蓄積による毒性獲得(gain of function)とそれとともなう核内からの消失による機能喪失(loss of function)の両者がALS発症にかかわると考えられるようになり、RNA代謝の

重要性が示唆された<sup>9)</sup>。さらにごく最近、多くの白人 ALS において C9ORF72 遺伝子非翻訳領域内の GGGGCC リピート配列の異常伸長が発見され、変性蛋白質の凝集・蓄積による神経変性メカニズムと異常 RNA の蓄積による神経変性メカニズムとの間にクロストークが存在する可能性が示唆された。

### 3. 神経変性と神経機能障害

神経変性疾患は、元来神経細胞の脱落・変性により発症すると定義されていたが、PolyQ 病モデルマウス脳の詳細な解析から、著明な神経細胞死が観察される以前から神経症状が出現し、さらに異常伸長 PolyQ 蛋白質の発現を遮断すると神経症状が改善することが示され、この神経症状は神経細胞死ではなくむしろ可逆性の神経機能障害に起因すると考えられるようになった。このような変性蛋白質の凝集・蓄積は、神経細胞内の蛋白質分解、転写調節、軸索輸送、ミトコンドリア、シナプスなどに様々な機能障害を惹き起こすことが明らかにされた。一方、PolyQ 病や ALS モデルマウスの神経症状は、個々の神経細胞内での機能障害だけではなく、神経回路内や神経—グリア間の細胞間ネットワークの障害も関与すること、さらに炎症・免疫など非神経細胞による細胞非自律的 (non-cell autonomous) な病態への寄与も示された<sup>10)</sup>。

### 4. 神経変性疾患の治療法確立へ向けて

上述のように、神経変性疾患は元来原因不明であったためこれまで有効な治療薬に乏しかったが、分子遺伝学的解析や細胞生物学、モデル動物をもちいた解析から発症分子メカニズムが明らかにされつつあり、それに基づいた分子標的治療薬開発への道が拓かれた。これまでに解明された神経変性疾患の病態機序に基づいて、変異遺伝子発現抑制、異常蛋白質のミスフォールディング・凝集抑制、異常蛋白質の分解促進、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤などによる転写活性化、ミトコンドリア機能障害の改善、神経細胞死抑制、神経栄養因子による神経細胞保護など、様々な治療標的に対して薬剤ハイスクリーンングなどによる治療薬候補の探索研究が進んでいる<sup>2)</sup>。また、RNAi をもちいた変異遺伝子の発現抑制や様々な治療標的に対する遺伝子治療などの研究もおこなわれている。さらに iPS 細胞などをもちいた神経再生の研究も始まっている。

一方で、神経変性疾患は緩徐進行性であるため、これらの研究成果から開発が期待される病態抑止治療法 (disease-modifying therapy) の有効性の評価には、長期間を要すると考えられ、臨床治験を実施するのは容易ではない。したがって、病態抑止を目的とした分子標的治療薬の開発へ向けては、

これまでの神経症状自体に対する対症治療法 (symptomatic therapy) とはことなり、将来の臨床治験において短期間での薬効判定に適した鋭敏な病態バイオマーカーの開発が望まれている<sup>11)</sup>。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれも有りません。

### 文 献

- 1) Ross CA, Poirier MA. Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:891-898.
- 2) Nagai Y, Popiel HA. Conformational changes and aggregation of expanded polyglutamine proteins as therapeutic targets of the polyglutamine diseases: exposed  $\beta$ -sheet hypothesis. *Curr Pharm Des* 2008;14:3267-3279.
- 3) Nagai Y, Inui T, Popiel HA, et al. A toxic monomeric conformer of the polyglutamine protein. *Nat Struct Mol Biol* 2007;14:332-340.
- 4) Aguzzi A, Rajendran L. The transcellular spread of cytosolic amyloids, prions, and prionoids. *Neuron* 2009;64:783-790.
- 5) Fujikake N, Nagai Y, Popiel HA, et al. Heat shock transcription factor 1-activating compounds suppress polyglutamine-induced neurodegeneration through induction of multiple molecular chaperones. *J Biol Chem* 2008;283:26188-26197.
- 6) Bauer PO, Goswami A, Wong HK, et al. Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. *Nat Biotechnol* 2010;28:256-263.
- 7) Douglas PM, Dillin A. Protein homeostasis and aging in neurodegeneration. *J Cell Biol* 2010;190:719-729.
- 8) La Spada AR, Taylor JP. Repeat expansion disease: progress and puzzles in disease pathogenesis. *Nat Rev Genet* 2010;11:247-258.
- 9) Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 2010;9:995-1007.
- 10) Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* 2009;187:761-772.
- 11) Katsuno M, Tanaka F, Sobue G. Perspectives on molecular targeted therapies and clinical trials for neurodegenerative diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012;83:329-335.

**Abstract****Keywords for study of pathological conditions of neurodegenerative diseases**

Yoshitaka Nagai, M.D., Ph.D.

Department of Degenerative Neurological Diseases, National Institute of Neuroscience,  
National Center of Neurology and Psychiatry

Molecular genetic analyses revealed that most neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis (ALS), and the polyglutamine diseases share a common molecular pathogenesis, namely protein misfolding and aggregation in the brain. Recently, prion-like transmission of these protein aggregates between cells has been suggested to contribute to the spread of neuropathology. To cope with protein aggregation, organisms have protein quality control systems, consisting of molecular chaperones and protein degradation, and therefore, an imbalance between protein aggregation and these systems would lead to neurodegeneration. Mouse models of neurodegenerative diseases exhibit neurological phenotypes before neuronal death, and these phenotypes are unexpectedly reversible, suggesting that neuronal dysfunction rather than death leads to neurological phenotypes. In addition to dysfunctions inside neurons, dysfunctions of the neuronal and neuro-glial networks also contribute to the pathogenesis in a non-cell autonomous fashion. On the other hand, another class of diseases including several spinocerebellar ataxias has been discovered to be caused by a repeat expansion mutation in untranslated RNA resulting in its accumulation, which is called the RNA repeat diseases. Recent discoveries of RNA-binding protein mutations and a repeat expansion mutation in ALS have highlighted the involvement of abnormal RNA metabolism in its pathogenesis. Recently, various researches on molecular-targeted therapies are in progress, which include high throughput chemical screening, RNAi, and gene therapy, etc. Towards development of a therapy for neurodegenerative diseases, sensitive biomarkers suitable for evaluation of therapeutic efficacy in clinical trials are eagerly anticipated.

(Clin Neurol 2012;52:874-876)

**Key words:** protein aggregation, quality control system, RNA repeat diseases, molecular-targeted therapy, biomarker



## ショウジョウバエなど小動物を用いた筋萎縮性側索硬化症モデル\*

● 藤掛伸宏\*\* / 長野清一\*\*\* / 永井義隆\*\*

**Key Words :** amyotrophic lateral sclerosis (ALS), TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43), fused in sarcoma (FUS), superoxide dismutase 1 (SOD1), *Drosophila*, *C. elegans*, zebrafish

### はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) の多くは孤発性に発症するが、およそ10%は家族性に発症することが知られている。家族性ALS (FALS) の原因遺伝子としては、1993年に一部のFALS家系においてsuperoxide dismutase 1 (SOD1) の遺伝子変異が初めて報告された<sup>1)</sup>。その後の研究から、変異SOD1蛋白質はミスフォールディングを起こして凝集し運動ニューロン内に細胞質封入体として蓄積する過程で毒性を獲得する (gain of function) と考えられるようになった<sup>2)</sup>。このSOD1遺伝子変異はFALSの約20%のみにしか認められない。

一方で、孤発性ALSや大多数のFALS患者の脊髄運動ニューロンで認められる封入体にはSOD1の蓄積は認めず、これらの封入体に凝集・蓄積している蛋白質は長らく不明であった。しかし、2006年に孤発性ALSにおける細胞質封入体の構成成分としてRNA結合蛋白質であるTAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) が同定され<sup>3)</sup>、続いて複数のFALS家系からTDP-43のさまざまな遺伝子変

異が同定された<sup>4)</sup>。そして、病理学的解析からTDP-43が運動ニューロン細胞質内に凝集・蓄積するだけでなく、本来の核内への局在が消失することが明らかとなり、ALSの発症メカニズムとして、TDP-43の凝集・蓄積による毒性獲得 (gain of function) とTDP-43の核内からの消失による機能喪失 (loss of function) のいずれか、もしくは両者がかかわると考えられるようになった<sup>5)</sup>。また、ALS患者で蓄積しているTDP-43は主にC末端側の断片であり、リン酸化修飾を受けていることが明らかにされた。そして、このようなTDP-43の凝集・蓄積および核内からの消失は、Tau蓄積を認めない前頭側頭葉変性症の一部や骨Paget病と前頭側頭葉型認知症を伴う遺伝性封入体筋炎 (inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia : IBMPFD) などにも共通して認められ、これらの疾患はTDP-43プロテノパチーと総称されている<sup>5)</sup>。

近年、TDP-43と同じRNA結合蛋白質に属するfused in sarcoma (FUS, 別名translocated in liposarcoma : TLS) の遺伝子変異が、SOD1およびTDP-43の遺伝子変異を持たないFALS家系の原因遺伝子として同定された<sup>6)7)</sup>。その病態では、やはり本来核に局在するFUSが細胞質内に凝集して封入体を形成していることから、変異FUSにお

\* Small animal models of amyotrophic lateral sclerosis such as *Drosophila* and *C. elegans* models.

\*\* Nobuhiro FUJIKAKE, Ph.D., \*\*\*Seiichi NAGANO, M.D., Ph.D. & Yoshitaka NAGAI, M.D., Ph.D.: 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第四部, \*\*\*疾病研究第五部 [〒187-8502 東京都小平市小川東町4-1-1]; Departments of Degenerative Neurological Diseases and \*\*\*Peripheral Nervous System Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan.

表 1 神経変性疾患のモデル化における小動物の特徴

	ショウジョウバエ	線虫	ゼブラフィッシュ	マウス
脊椎/無脊椎動物	無脊椎動物	無脊椎動物	脊椎動物	脊椎動物
寿命	60日	21日	4年	2.5年
世代時間	10日	3日	90日	63日
多産性	250卵/個体	200卵/個体	200卵/産卵	8頭/出産
飼育スペース	バイアル瓶/ インキュベーター	シャーレ/ インキュベーター	水槽	専用ケージ/ 専用施設
ヒト相同遺伝子の保存性	70%	60%	—	99%
遺伝子発現 個体作製法	Tg	Tg	・ mRNA注入 ・ Tg	・ Tg ・ ウイルス感染
遺伝子機能喪失 個体作製法	・ RNAi Tg ・ 変異導入剤曝露 ・ トランスポゾン	・ siRNAの給餌 ・ 変異導入剤曝露	・ AMO注入 ・ 変異導入剤曝露	KO
薬剤スクリーニング	容易	容易	容易	困難
遺伝子スクリーニング	容易	容易	困難	困難

Tg：トランスジェニック，KO：ノックアウト，AMO：アンチセンスモルフォリノ。

いてもTDP-43と同様に凝集・蓄積によるgain of functionと核内からの消失によるloss of functionがALS発症にかかわると考えられている。さらにTauやTDP-43の蓄積を認めない前頭側頭葉変性症の一部でも同様にFUSの凝集・蓄積，核局在消失が生じることから，これらは総称してFUSプロテインパチーと呼ばれている<sup>9)</sup>。

以上のようにALS発症の原因蛋白質として，SOD1やTDP-43，FUSが発見されたが，その発症分子メカニズムを解明するためにはこれらの分子病態に基づいたモデル動物を用いた研究が必須である。しかし，これまで疾患モデル動物としてもっとも汎用されてきたマウスなどのげっ歯類では，モデルの樹立・解析に膨大な時間，労力，設備，費用が必要となる。そのため最近では，ショウジョウバエや線虫，ゼブラフィッシュなどの遺伝子操作がしやすく，個体レベルでの病態解析を行うことができ，狭い飼育スペースで多数の系統の維持が可能でハイスループット解析に適した小動物を用いて神経変性疾患のモデル化を試みる研究が盛んに行われている(表1)。

ショウジョウバエは，世代時間が約10～14日とマウスと比べて非常に短く，遺伝子の約70%はヒトにも相同遺伝子が存在し，さらにヒト疾患遺伝子の約75%がショウジョウバエにも保存されている。また，遺伝学，発生学のモデル生物として長年利用されてきたために遺伝子改変体の作製やその解析技術が蓄積されており，多

数の遺伝子変異体や組換え体系統などがストックセンターに整備されている。したがって，それらを用いて個体レベルでの遺伝学スクリーニングを短期間で効率的に行うことができ，また，比較的少量の薬剤での治療薬スクリーニングにも適している。線虫も世代時間が3日と短く，RNAiによる遺伝子ノックダウンが容易に行えるため，ショウジョウバエと同様にハイスループットな遺伝学的スクリーニングや治療薬スクリーニングに適している。また，体が透明であるため生きたままの蛍光観察が可能であるという特徴がある。ゼブラフィッシュは脊椎動物でありながらも飼育が容易で多産であり，mRNAやアンチセンスモルフォリノを直接インジェクションすることで遺伝子発現やノックダウンを容易に解析することができる。一方，個体を薬液中で飼育することにより治療薬スクリーニングを行うことも可能である。また，胚が透明であるため線虫と同様に生きたままの蛍光観察が可能である。

以上のような利点を生かして，実際に，Alzheimer病，Parkinson病，ALSなどさまざまな神経変性疾患の小動物モデルがこれまで樹立され，病態解明・治療法開発研究に多大な貢献を果たしている<sup>8)~10)</sup>。本稿では，これまでに樹立されたALSの動物モデルのうち，特に小動物モデルに焦点を当て，最新の研究成果について概説する。

## TDP-43がかかわる ALSの小動物モデル

### 1. 機能喪失(loss of function)仮説に基づいたモデル

TDP-43は、pre-mRNAのスプライシングやmRNAの輸送、翻訳調節などさまざまなRNA代謝プロセスにかかわるRNA結合蛋白質であり、二つのRNA認識モチーフ(RRM1, RRM2)とC末端側に蛋白質間相互作用にかかわるグリシンリッチドメインを持つ。細胞内では主に核に局在しているが、核移行シグナル(NLS)と核外移行シグナル(NES)の両方を持ち、核-細胞質間をシャトルしていると考えられている。FALSにおけるTDP-43遺伝子の変異は、C末端のグリシンリッチドメイン内に集中している。ALS病態では、前述のようにTDP-43の核局在の消失によりloss of functionが生じると考えられている<sup>5)</sup>。

#### a. ショウジョウバエモデル

TDP-43のloss of function仮説に基づいた初めての動物モデルとして、2009年にFeiguinらはトランスポゾン挿入変異体ショウジョウバエからTDP-43遺伝子が欠失したショウジョウバエを作製し、その病態解析結果を報告した<sup>11)</sup>。TDP-43欠失変異体は発生段階で半致死を示し、成虫まで発生した個体でも運動障害、寿命短縮を認めた。病理学的には運動ニューロンの軸索分岐、シナプス前終末ボタンの減少が認められたが、神経細胞死は明らかではない。さらにこのTDP-43欠失変異体のシナプス前終末ボタンで微小管結合蛋白質futsch/MAP1B mRNA, アセチル化微小管が減少していることが最近明らかにされた<sup>12)</sup>。そして、TDP-43の発現によってこれらの表現型が回復するが、RNA結合能を欠くRRM1変異型TDP-43では回復しないことから、ALSはTDP-43のloss of functionにより発症すると考察した。続いてLuらは、化学的な遺伝子変異導入によりTDP-43遺伝子変異体ショウジョウバエを作製し、やはり神経樹状突起の分岐が減少して半致死を示すことから、同様にTDP-43のloss of function仮説を支持する結果を得ている<sup>13)</sup>。

#### b. ゼブラフィッシュモデル

ゼブラフィッシュモデルでは、2010年にKabashi

らはアンチセンスモルフォリノのインジェクションによるTDP-43のノックダウンにより、運動ニューロン軸索の短縮・分岐増加をきたし、運動障害を呈することを明らかにした<sup>14)</sup>。そして、野生型TDP-43 mRNAのインジェクションにより表現型が回復するが、FALS変異型TDP-43(A315T, G348C, A382T)では回復しないことを示した。しかしながら、変異型TDP-43の過剰発現でも同様の表現型を生じることから、TDP-43変異によるloss of functionに加えてgain of functionの両方のメカニズムがALS発症に寄与すると考察した。

一方、Ashらは線虫のTDP-43欠失変異体では明らかな運動障害を認めないことを報告している<sup>15)</sup>。そして、むしろヒト野生型TDP-43の発現により運動障害を示したことから、gain of function仮説を支持する結果を報告している(後述)。

### 2. 毒性獲得(gain of function)仮説に基づいたモデル

#### a. ショウジョウバエモデル

TDP-43のgain of function仮説に基づいたショウジョウバエモデルは、2010年にLiらにより初めて報告された<sup>16)</sup>。彼らは、ヒト野生型TDP-43を発現するトランスジェニックショウジョウバエを作製した。そして、TDP-43を複眼で発現させたところ進行性的な変性が生じ、運動ニューロンでの発現では発生段階での半致死を示し、運動障害を呈することを明らかにした。病理学的には運動ニューロン軸索の腫大、軸索分岐の減少、シナプス前終末ボタンの減少を認め、TDP-43は主に核内へ局在したが、一部で細胞質内封入体、細胞死を認めた。また、生化学的にもALS患者と同様のTDP-43 C末断片の蓄積を認めた。さらに重要なことに、内在性TDP-43のRNAiノックダウンによりこの運動障害が改善することを示し、ALSはTDP-43のloss of functionではなく、gain of functionのメカニズムにより発症すると結論した。

続いてHansonらも、ヒト野生型TDP-43を発現するショウジョウバエにおいて進行性複眼変性、運動障害、寿命短縮をきたすことを示した<sup>17)</sup>。しかし、TDP-43の細胞質封入体は認めず、TDP-43は核局在を示したことから、封入体は神経変性の原因ではなく、TDP-43の核内での機能異常がALSの発症に寄与すると考察した。しかしRitson



らは、TDP-43のNLS変異型およびNES変異型を発現するショウジョウバエを作製し、細胞質に局在するNLS変異型では野生型に比べ重度の複眼変性を示す一方で、核局在するNES変異型では表現型が生じないことを明らかにした<sup>18)</sup>。そして、FALS変異型TDP-43(M337V)も細胞質局在を示して複眼変性を増悪し、さらにIBMPFDの原因である変異型valosin-containing protein (VCP)の共発現により野生型TDP-43の細胞質局在が誘導され複眼変性が増悪することから、TDP-43の異常な細胞質局在がTDP-43プロテオパチーの発症に寄与していると結論した。一方Miguelらは、NES変異型は複眼での発現ではRitsonらと同様に明らかな表現型を示さないが、神経系では野生型、NLS変異型だけでなくNES変異型でも明らかな寿命短縮をきたしたことから、細胞質だけでなく核内TDP-43も神経毒性を持つと結論した<sup>19)</sup>。

FALS変異がTDP-43の神経毒性に与える影響に関しては、Voigtらは多数のFALS変異型TDP-43(G287S, A315T, G348C, A382T, N390D)について検討し、神経系での発現による寿命短縮、運動ニューロンでの発現による運動障害などの表現型の明らかな増悪を認めないことを報告している<sup>20)</sup>。一方Estesらは、運動ニューロンでの発現では野生型と異なりFALS変異型TDP-43(A315T)は半致死、運動障害などの表現型を呈さないが、幼虫期にはむしろFALS変異型の方が重度の運動障害を示すことを報告している<sup>21)</sup>。しかしEldenらは、FALS変異型TDP-43(Q331K)では野生型に比べて運動障害の明らかな増悪効果を見出している<sup>22)</sup>。さらにGuoらによる生化学的解析も含めた詳細な検討では、FALS変異が集積しているTDP-43 C末端のグリシンリッチドメインの配列はプリオン蛋白質と類似しており、実際にFALS変異A315TによりTDP-43の凝集性が增大することが示された。そして、Estesらとは別のプロモーターによる運動ニューロンでの発現では、FALS変異型TDP-43(A315T)により運動障害、運動ニューロン軸索の脱落が増悪することを見出した<sup>23)</sup>。

一方Liらは、ALS病態で認められるTDP-43のリン酸化の意義を明らかにするため、野生型TDP-43のC末端断片およびC末端断片配列中のセリンをアラニンに置換したリン酸化耐性変異型、アス

パラギン酸に置換したリン酸化模倣変異型を発現するショウジョウバエモデルを作製した<sup>24)</sup>。その結果、野生型およびリン酸化耐性変異型C末端断片は細胞質および核内に封入体を形成したが、リン酸化模倣変異型では封入体を認めなかったことから、TDP-43のリン酸化は封入体形成を抑制する防御的な機構であると考察した。しかし、これらショウジョウバエの表現型は解析しておらず、神経変性とTDP-43リン酸化の関連については不明である。

そのほかにVoigtらは前述の論文で、TDP-43のNLS変異あるいはFALS変異による表現型の増悪は明らかではなかったが、注目すべきことに、RNA結合能を欠くRRM1変異型TDP-43ではこれらの表現型が消失もしくは減弱することを明らかにし、TDP-43のRNA結合活性が神経変性にかかわると考察している<sup>20)</sup>。

このように新しく樹立されたALSモデルショウジョウバエを用いて、その利点を生かした遺伝学的解析による病態研究も進んでいる。Estesらは前述の論文で、TDP-43の凝集・蓄積を認めたことから、病態における蛋白質ミスフォールディング・凝集の役割を検討した<sup>21)</sup>。その結果、蛋白質分解の主要経路であるプロテアソームのサブユニットβ2変異体の共発現により複眼変性が増悪し、蛋白質ミスフォールディングを防ぐ分子シャペロンHsp70の共発現により複眼変性が抑制されることを示し、TDP-43のミスフォールディング・凝集がALS発症に重要な役割を果たすことを明らかにした。またEldenらは、脊髄小脳失調症2型の原因遺伝子でありRNA代謝に関与するataxin-2とTDP-43の遺伝学的相互作用を検討したところ、TDP-43発現による複眼変性および寿命短縮はataxin-2の共発現により増悪し、ataxin-2遺伝子欠失により抑制されることを見出した<sup>22)</sup>。さらにALS患者で認められるTDP-43封入体にataxin-2が蓄積していること、そして、もっとも重要なことにataxin-2遺伝子内のCAGリピート長が27~33回である中間伸長型アレルがALS発症の危険因子となることを発見した。

#### b. 線虫モデル

2010年にAshらは、ヒト野生型TDP-43を神経系で発現するトランスジェニック線虫を作製し

たところ運動ニューロン軸索束の脱束化, シナプス数の減少をきたし, 運動障害を生じることを明らかにした<sup>15)</sup>. この線虫モデルではTDP-43の封入体は認めず, TDP-43は核局在を示した. 続いてNLS欠失型, RRM欠失型あるいはスプライシング活性を欠失したC末端欠失型TDP-43の発現では運動障害を認めないことを示し, ALSでは核内TDP-43のRNA代謝活性により神経変性が生じると結論した.

Liachkoらは, FALS変異型TDP-43 (G290A, A315T, M337V)の神経系での発現により野生型に比べ運動障害が増悪し, 運動ニューロンの脱落を生じることを明らかにした<sup>25)</sup>. この時, TDP-43は核に局在し, ALS患者と同様なリン酸化および断片化が生じていた. TDP-43 C末端のセリンをアラニンに置換したリン酸化耐性変異型では, 表現型への影響は認められなかった.

一方Zhangらは, ヒト野生型, FALS変異型TDP-43 (Q371K, M337V)あるいはTDP-43 C末断片 (TDP-C25)を神経系で発現する線虫はいずれも神経症状を呈し, 野生型, FALS変異型TDP-43は凝集していることを生化学的に示し, さらに凝集性の高いTDP-C25では細胞質封入体を形成することを見出した<sup>26)</sup>. そして, 分子シャペロンの発現を誘導する熱ショック転写因子HSF1やdaf-16の機能喪失によりTDP-C25の凝集・蓄積が促進されて運動障害が増悪し, 分子シャペロン発現を負に制御するインスリン/インスリン様成長因子受容体daf-2の変異により不溶性TDP-43が減少して運動障害が改善することを明らかにした. 以上の結果から, TDP-43の神経毒性には蛋白質のミスフォールディング・凝集が関与していると考察している.

#### c. ゼブラフィッシュモデル

Kabashiらは前述の2010年の論文で, ゼブラフィッシュ胞胚へのmRNAインジェクションにより野生型あるいはFALS変異型TDP-43 (A315T, G348C, A382)を一過性に発現させたところ, TDP-43ノックダウンと同様に運動ニューロンの軸索の短縮・分岐増加, 運動障害などをきたしたが, FALS変異型ではその頻度が有意に高いことを明らかにした<sup>14)</sup>. この結果から, 前述のようにgain of functionとloss of functionの両メカニズムの寄

与を提唱している.

## FUSがかかわる ALSの小動物モデル

### 1. 機能喪失(loss of function)仮説に基づいたモデル

FUS/TLSはTDP-43と同様にさまざまなRNA代謝プロセスにかかわるRNA結合蛋白質であり, やはりRNA認識モチーフ(RRM)とN末端側にグリシンリッチドメインを持つ. 神経細胞内では主に核に局在しているが, やはりNLSとNESの両方を持ち核-細胞質間をシャトルしており, 核内ではmRNAの転写, スプライシングに働いているが, 注目すべきことに細胞質では樹状突起スパインへRNAを輸送し, 局所的蛋白質翻訳に関与すると考えられている. ALS病態では, 前述のようにFUSの核局在の消失によりloss of functionが生じると考えられており, FALS変異の多くはC末端のNLS配列内に集積している<sup>5)</sup>.

#### a. ショウジョウバエモデル

FUSのloss of function仮説に基づいたショウジョウバエモデルとして, 2011年にWangらは, 前述のFeiguinらと同様の手法でFUS遺伝子欠失ショウジョウバエを作製した<sup>27)</sup>. このFUS欠失変異体は発生段階で半致死を示し, 成虫まで発生した個体でも運動障害, 寿命短縮を呈した. この表現型はヒト野生型FUSの発現により回復するがFALS変異型FUS (R522G, P525L)では回復しないことを示し, FALS変異によるFUSの機能喪失を明らかにした. 一方, FUS遺伝子欠失による表現型はTDP-43の発現では回復しないが, TDP-43遺伝子欠失による表現型はFUSの発現によって回復することを見出し, 遺伝学的にFUSがTDP-43の下流にあることを明らかにした. さらに免疫共沈降によりFUSとTDP-43とが直接結合することを示し, ALSはTDP-43とFUSの両者がかかわる共通の機能が破綻することにより発症すると考察している.

#### b. ゼブラフィッシュモデル

Kabashiらは, ゼブラフィッシュ胞胚にアンチセンスモルフォリノをインジェクションして, FUSノックダウンゼブラフィッシュを作製した<sup>28)</sup>. その結果, 運動ニューロン軸索の短縮・分岐減

少, 運動障害を呈することを明らかにした. さらにこれらの表現型はヒト野生型FUSの発現により回復するが, FALS変異型FUS(R521C, R521H)では回復しないことを示し, FUSのloss of functionによることを明らかにした. しかしながら, R521H変異型の発現のみでも同様の表現型が認められたことから, R521H変異ではloss of functionに加えてgain of functionの両者がALS発症に寄与すると考察している. さらにTDP-43とFUSの遺伝学的な相互作用についても解析を行い, FUSとTDP-43のダブルノックダウンでは相乗的な増悪効果を認めなかったことから, 両者の関連性が示唆された. そして, FUSノックダウンによる表現型はTDP-43の発現により回復しないが, TDP-43ノックダウンによる表現型はFUSの発現により回復することを明らかにし, 上述のWangらと同様にTDP-43のloss of functionの下流でFUSが関与するというALS発症メカニズムを考察した.

## 2. 毒性獲得(gain of function)仮説に基づいたモデル

### a. ショウジョウバエモデル

FUSのgain of function仮説に基づいたモデルとして, Lansonらはヒト野生型およびFALS変異型FUS(R518K, R521H, R521C)を発現するトランスジェニックショウジョウバエを作製した<sup>29)</sup>. その結果, 複眼での発現では野生型FUSに比べFALS変異型で複眼変性が増悪し, 神経系での発現ではFALS変異型のみで半致死を示し, さらに寿命短縮, 運動障害などの表現型もFALS変異型で増悪した. 病理学的な解析から, 野生型FUSは核局在を示すがFALS変異型では細胞質にも局在することが明らかになった. FUSの封入体形成については記述されていない. そして, FALS変異による増悪効果はNES変異により抑制されたことから, FUS病態における細胞質局在の重要性を指摘した. さらに, FUSとTDP-43との共発現実験により複眼変性が相乗的に増悪し, FUS, TDP-43のいずれかのFALS変異によりさらに増悪することを明らかにし, TDP-43, FUSの両者が協調的に神経変性を引き起こす可能性を考察した.

続いてChenらも, ヒト野生型FUSの複眼での発現により進行性複眼変性を, 運動ニューロンでの発現では神経筋接合部シナプスボタンの減

少, 運動障害をきたし, さらにFALS変異型FUS(R524S, P525L)では表現型が増悪することを明らかにした<sup>30)</sup>. 野生型FUSは主に核局在を示すが, FALS変異型はやはり核と細胞質に局在していた. 一方, FUSのRNAiによるノックダウンでは明らかな表現型が生じなかったことから, ALSはFUSのgain of functionにより発症すると考察した.

Miguelらもヒト野生型FUSを発現するショウジョウバエを作製し, 複眼変性, 寿命短縮が生じることを報告した<sup>31)</sup>. やはりFUSは核に局在し, 細胞質封入体は認めなかったが, 生化学的な解析ではFUSの不溶化を認めた. さらに, 分子シャペロンHsp70の共発現によりFUSが可溶化され寿命短縮が抑制されることを明らかにし, 不溶性FUSの毒性によりALSが引き起こされると結論した.

### b. 線虫モデル

今年に入ってMurakamiらは, ヒト野生型, さまざまなFALS変異型およびNLSを含むC末端の欠失変異型FUSを神経系で発現するトランスジェニック線虫モデルを報告した<sup>32)</sup>. その結果, 野生型および軽症FALS変異型FUS(R514G, R521G)では明らかな表現型を認めなかったが, 中等度変異型(R522G)や重症変異型(P525L), C末欠失変異型では進行性運動障害, 寿命短縮をひき起こした(重症型>中等度型). 野生型, 軽症FALS変異型FUSは核に局在するが, 中等度型や重症変異型, C末欠失変異型では核と細胞質に局在して封入体を形成し, 中等度型より重症型の方が細胞質局在を示す割合が高かった. さらにRFPを付加した野生型FUSとFALS変異型との共発現実験では, 野生型FUSは正常通り核に局在しFALS変異型の封入体には巻き込まれないこと, また, 野生型FUSの共発現により運動障害は回復しないことを明らかにし, FALS変異型は野生型FUSの生理活性とは無関係にgain of functionにより毒性を獲得してALSをひき起こすと考察した.

### c. ゼブラフィッシュモデル

Kabashiらは前述の論文で, 野生型FUSの発現ではゼブラフィッシュに明らかな表現型は生じず, FALS変異型FUS(R521H)では運動ニューロン軸索の短縮・分岐減少, 運動障害をきたすことを明らかにした. さらに野生型FUSの共発現で

は回復しなかったことから、R521H変異ではloss of functionに加えてgain of functionのメカニズムもALS発症に寄与する可能性を示した<sup>28)</sup>。一方、gain of functionが示唆されるFALS変異型FUS R521HとTDP-43 G348Cとの共発現では、Lansonらの結果と異なり相乗的な増悪効果は認められなかった。

### SOD1がかかわる ALSの小動物モデル

SOD1は細胞に有害なスーパーオキシドアニオン $O_2^-$ を過酸化水素と酸素に変換し、細胞を酸化ストレスから保護する酵素である。SOD1は1993年に初めてのFALSの原因遺伝子として報告されて以来<sup>1)</sup>、その遺伝子変異によりSOD1のloss of functionではなく、gain of functionのメカニズムによりALSをひき起こすと考えられている<sup>2)</sup>。

#### 1. 毒性獲得(gain of function)仮説に基づいたモデル

##### a. ショウジョウバエモデル

SOD1変異によるALSモデルショウジョウバエ作製の試みは1999年に初めて報告された<sup>33)</sup>。Eliaらは、ヒト野生型およびFALS変異型SOD1(G41S)を運動ニューロンで発現するトランスジェニックショウジョウバエを作製した。しかし、運動ニューロンでのSOD1活性の上昇により寿命が延びることが知られており、SOD1活性を保持しているSOD1 G41Sの過剰発現ではやはり寿命が延長し、運動障害などの症状は認めなかった。

続いて2003年にMockettらは、内在性SOD1遺伝子を欠失しかつヒト野生型およびFALS変異型SOD1(G93C, G37R, A4V, G41D, I113T)を内在性SOD1のプロモーター下で発現するショウジョウバエを作製した<sup>34)</sup>。その結果、変異型SOD1の発現により寿命短縮をきたし、一部の变異型SOD1では進行性の運動障害が認められた。しかし、この寿命短縮は野生型SOD1の共発現により回復したことから、この表現型はSOD1活性の低下によるものであり、ALS病態で想定されているgain of functionによる表現型をモデル化できていないと結論した。

変異SOD1によるALSのショウジョウバエモデルの樹立は、2008年になりようやく成功した<sup>35)</sup>。

Watsonらは、ヒト野生型およびFALS変異型SOD1(A4V, G85R)を運動ニューロンで発現させたところ、Eliaらの結果と異なり寿命延長は認めず、進行性の運動障害を呈することを明らかにした。運動ニューロンの脱落は認めなかったが、電気生理学的解析では運動神経回路における伝達異常が認められた。野生型および変異型SOD1は運動ニューロン細胞質内に封入体様の蓄積を示し、加齢とともに増加した。以上のことから、ショウジョウバエにおいても変異SOD1の神経毒性が示された。

##### b. 線虫モデル

FALS変異型SOD1を発現するトランスジェニック線虫モデルは2001年に初めて作製された<sup>36)</sup>。Oedaらは、ヒト野生型およびFALS変異型SOD1(A4V, G37R, G93A)を全身に発現するトランスジェニック線虫を作製したが、変異型SOD1は分解されやすく明らかな表現型は認めなかった。しかし、酸化ストレス曝露下では変異型SOD1の分解は抑制され、FALS変異型線虫のみで寿命短縮を示した。骨格筋での発現では、やはり酸化ストレス曝露下で変異型SOD1の封入体が検出された。

2009年にWangらは、YFPを付加したヒト野生型およびFALS変異型SOD1(G85R)を神経系に発現するトランスジェニック線虫を報告した<sup>37)</sup>。その結果、野生型SOD1の発現では表現型を認めなかったが、FALS変異型SOD1では運動障害を呈し、不溶性の変異型SOD1が神経細胞内に封入体として蓄積していた。そして特筆すべきことに、このSOD1 G85R-YFP発現線虫が透過性であるため封入体が可視化できるという特性を生かして、大規模なsiRNAライブラリー(16,757種)から封入体形成にかかわる遺伝子の網羅的スクリーニングを行い、分子シャペロンや蛋白質分解、蛋白質の翻訳後修飾にかかわる遺伝子など81遺伝子を同定した。

##### c. ゼブラフィッシュモデル

2007年にLemmensらは、ゼブラフィッシュ胚にヒト野生型およびFALS変異型SOD1(A4V, G37R, G93A)のmRNAをインジェクションして、SOD1発現ゼブラフィッシュモデルを作製した<sup>38)</sup>。その結果、野生型に比べてFALS変異型SOD1の発現では運動ニューロン軸索の短縮をきたした。